

ETUDE D'UNE TECHNIQUE

PERMETTANT
LA DÉTERMINATION DU SENS ET DE LA VALEUR
DES RÉSULTATS
DOUTEUX OU FAIBLEMENT POSITIFS
DANS
LA RÉACTION DE BORDET-WASSERMANN

THÈSE

Présentée et publiquement soutenue devant l'Ecole Supérieure de Pharmacie de Montpellier

Le 12 Juillet 1919

PAR

Pierre COMTE

PHARMACIEN-MAJOR DE L'ARMÉE

POUR OBTENIR LE DIPLOME DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

(MENTION PHARMACIE)

JURY : { ASTRUC, professeur, *président*.
 { FONZES DIACON, professeur.
 { A. JUILLET, profess.-agrégé. } *assesseurs.*

MONTPELLIER

IMPRIMERIE FIRMIN ET MONTANE

3, RUE FERDINAND-FABRE ET QUAI DU VERDANSON

1919

ETUDE D'UNE TECHNIQUE
PERMETTANT
LA DÉTERMINATION DU SENS ET DE LA VALEUR
DES RÉSULTATS
DOUTEUX OU FAIBLEMENT POSITIFS
DANS
LA RÉACTION DE BORDET-WASSERMANN



Digitized by the Internet Archive
in 2026

ETUDE D'UNE TECHNIQUE

PERMETTANT

LA DÉTERMINATION DU SENS ET DE LA VALEUR

DES RÉSULTATS

DOUTEUX ou FAIBLEMENT POSITIFS

DANS

LA RÉACTION DE BORDET-WASSERMANN

THÈSE

Présentée et publiquement soutenue devant l'Ecole Supérieure de Pharmacie de Montpellier

Le 12 Juillet 1919

PAR

Pierre COMTE

PHARMACIEN-MAJOR DE L'ARMÉE

POUR OBTENIR LE DIPLOME DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER
(MENTION PHARMACIE)

JURY : { ASTRUC, professeur, *président*.
 { FONZES DIACON, professeur. { *assesseurs*.
 { A. JUILLET, profess.-agrégé. {

MONTPELLIER

IMPRIMERIE FIRMIN ET MONTANE

3, RUE FERDINAND-FABRE ET QUAI DU VERDANSON

1919



Ecole Supérieure de Pharmacie de Montpellier

ADMINISTRATION

MM. G. MASSOL (I. P. ☉)	<i>Directeur.</i>
F. JADIN (I. P. ☉)	<i>Assesseur.</i>
E. IZARD (I. P. ☉)	<i>Secrétaire.</i>
H. GOT (I. P. ☉)	<i>Secrétaire honoraire.</i>

PROFESSEURS

MM. L. COURCHET (I. P. ☉)	{ <i>Histoire naturelle des médicaments. Botanique.</i>
G. MASSOL (I. P. ☉)	<i>Physique.</i>
C. ASTRE (I. P. ☉)	<i>Chimie générale.</i>
N.	<i>Matière médicale.</i>
F. JADIN (I. P. ☉)	<i>Pharmacie.</i>
H. IMBERT (I. P. ☉)	<i>Chimie analyt. et Toxicologie</i>
H. FONZES-DIACON (I. P. ☉)	<i>Chimie minérale.</i>
A. ASTRUC (I. P. ☉)	{ <i>Pharmacie galénique industrielle.</i>

CHARGÉS DE COURS

MM. H. IMBERT (I. P. ☉)	<i>Toxicologie.</i>
P.-J. TARBOURIECH (※, I. P. ☉)	{ <i>Chimie biologique.</i> <i>Chimie organique.</i>
M.-A. FAUCON (A. ☉)	{ <i>Hydrologie.</i> <i>Hygiène.</i>
A. JUILLET (A. ☉)	{ <i>Zoologie. Botanique cryptogamique.</i>
MOYE, prof. Fac. Droit (I. P. ☉)	<i>Législation pharmaceutique.</i>

AGRÉGÉS

MM. L. GAUCHER (I. P. ☉)
P.-J. TARBOURIECH (※, I. P. ☉)
M. A. FAUCON (A. ☉)
A. JUILLET (A. ☉)

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

MM. M.-A. FAUCON (A. ☉)	<i>Physique.</i>
A. JUILLET (A. ☉)	<i>Histoire naturelle.</i>
FARRÉ (A. ☉)	<i>Chimie et Pharmacie.</i>

NOTA. — L'École de Pharmacie n'accepte la responsabilité d'aucune des opinions émises par les candidats dans les Thèses ou Synthèses qui lui sont présentées.

ÉTUDE D'UNE TECHNIQUE

PERMETTANT

LA DÉTERMINATION DU SENS ET DE LA VALEUR

DES RÉSULTATS

DOUTEUX OU FAIBLEMENT POSITIFS

DANS

LA RÉACTION DE BORDET-WASSERMANN

GENERALITES

Nombreux sont les travaux publiés sur la réaction de Wassermann primitive et ses modifications. Par contre, bien peu d'auteurs semblent s'être attachés à l'étude des retards d'hémolyse et des hémolyses partielles, passage du résultat négatif au résultat positif, dont le terme est souvent difficile à déterminer et qui intéresse cependant un nombre important de sérums.

Dans l'édition la plus récente de son ouvrage, sur les « Nouvelles méthodes de séro-diagnostic », Joltrain a pu dire: « La cause des retards d'hémolyse observés dans certaines réactions, est un vaste champ ouvert aux investigations ».

Vernes a proposé la détermination des différents degrés d'hémolyse suivant une échelle colorimétrique qui pourrait

permettre d'uniformiser l'appréciation des différents opérateurs. Mais on sait que les retards d'hémolyse ne sont pas seulement causés par des anticorps syphilitiques. Des affections étrangères à la syphilis peuvent également les produire.

Nous avons entrepris l'étude de la distinction de ces causes d'hémolyse partielle et de la détermination de leur quantité, en considérant le résultat de la réaction, non plus d'après le degré d'hémolyse totale, partielle ou nulle, dans un temps donné, le même pour tous les sérums, mais d'après *le rapport du temps nécessaire pour obtenir l'hémolyse totale dans les tubes à antigène au temps nécessaire pour obtenir l'hémolyse totale dans le tube témoin* (1).

Sur cette base, et après étude sur un millier de sérums, nous avons adopté une méthode d'évaluation de la durée d'hémolyse qui nous a permis d'atteindre ce double but dont l'intérêt n'échappe à personne :

- 1° Distinguer les retards d'hémolyse causés par l'infection syphilitique de ceux dus à d'autres maladies ;
- 2° Déterminer le degré d'infection syphilitique toutes les fois que celui-ci n'est pas suffisant pour donner une réaction franchement positive.

La discussion de cette méthode, basée sur la durée d'hémolyse font l'objet du présent travail.

Nous étudierons d'abord les raisons du choix que nous avons fait de cette méthode, puis, successivement, chacun des éléments de la réaction. De cette étude découlera de lui-même l'exposé de notre technique et l'interprétation des résultats.

(1) Nous avons appliqué cette méthode à l'examen de 1561 sérums, dans la période comprise entre les 15 juin 1917 et le 30 juin 1919, avec des résultats tout à fait satisfaisants.

Nous avons cru devoir approfondir, au cours de nos expériences, certaines données encore imparfaitement déterminées, soit que peu de chose ait été dit sur elles, soit que les notions connues fussent encore discutées ou ne nous parussent pas conformes à nos constatations.

On retrouvera en particulier la trace de ces recherches personnelles à propos du pouvoir hémolytique naturel du sérum humain, vis-à-vis des globules de quelques animaux.

CHOIX DE LA METHODE

C'est la préparation par Wassermann d'un antigène spécifique qui a permis l'application de la découverte de Bordet à la recherche de la déviation du complément par les anticorps syphilitiques dans les sécrétions humorales et, plus particulièrement, dans le sérum sanguin.

La technique à laquelle se sont arrêtés Wassermann et ses élèves consiste essentiellement à détruire, par la chaleur à 56°, le complément naturel du sérum, thermolabile à cette température, puis à le remplacer par une quantité déterminée du complément contenu dans du sérum de cobaye titré. On ajoute ensuite l'antigène et l'on constate la déviation par le moyen d'un système hémolytique approprié.

Ce système hémolytique est lui-même constitué par un sérum hémolytique de lapin décomplémenté et les globules adéquats.

Cette technique primitive de Wassermann, simple application de la méthode de Border-Gengou, a toujours été défendue comme intangible par ses promoteurs et leurs élèves, aussi bien que par de nombreux adeptes.

Il faut cependant reconnaître qu'elle est tout empirique. Aucun de ses facteurs n'est connu autrement que par un petit nombre de propriétés, et pour ce seul motif, elle ne peut se prévaloir du caractère indiscutable d'une réaction de chimie pure.

A l'heure actuelle, il est en effet reconnu :

1° Que le chauffage à 56° atténue sensiblement les anticorps syphilitiques et peut même les détruire parfois complètement : il en est ainsi au début de la syphilis et, en fin de traitement, par l'arséno-benzol (1) ;

2° Que les hémolysines naturelles résistent à cette température et que leur présence en quantité parfois notable peut, si l'on n'en tient pas compte, troubler ou même fausser la réaction ;

3° Qu'il est préférable d'éviter d'introduire dans la réaction des sérums étrangers dont on ne peut dire encore d'une manière certaine qu'ils n'apportent pas le moindre trouble.

D'autre part, la méthode primitive de Wassermann nécessite des opérations multiples et de longue haleine. De nombreux auteurs ont cherché à la simplifier et même à augmenter sa sensibilité tout en conservant la même sécurité.

La modification de beaucoup la plus importante a consisté à supprimer le chauffage à 56°. En même temps qu'elle simplifiait les opérations, cette modification répondait à la critique relative à l'atténuation par la chaleur du pouvoir des anticorps.

Il suffisait, dès lors, soit d'utiliser pour la réaction, le complément naturel du sérum examiné (Hecht, Bénard et Joltrain, Tschernogubow, etc.), soit de n'en pas tenir compte en n'employant que de très petites quantités de ce sérum par rapport aux autres éléments (Noguchi).

La présence, dans le sérum humain, d'hémolysines natu-

(1) Gérard. *C. R. Soc. biol.*, 9 février 1918, t. LXXXI, p. 128.

relles se rencontre d'une manière à peu près constante. Ainsi que nous le verrons plus loin, la proportion de ces hémolysines est variable avec chaque sérum; mais leur activité se montre surtout sensible vis-à-vis des globules les plus communément employés du mouton et du lapin. De nombreuses méthodes ont été proposées, non pas seulement en vue d'éviter cet inconvénient, mais afin de le mettre à profit en utilisant ces hémolysines naturelles pour les substituer au sérum de lapin préparé à cet effet (Hecht, Bauer, Hallion, Tribondeau, Foix, etc.).

La troisième critique adressée à la réaction de Wassermann primitive: introduction d'éléments étrangers (sérums d'animaux), n'a pas été signalée jusqu'à ce jour comme pouvant avoir une importance aussi grande que les autres, mais on ne peut pas affirmer, dans l'état de notre ignorance actuelle sur la constitution de ces liquides complexes, que la présence de ces sérums étrangers n'apporte pas quelque trouble dans la réaction. Joltrain (1), puis Ronchèse, n'ont-ils pas signalé déjà (2) que l'antigène syphilitique absorbe moins facilement le complément de cobaye que le complément humain?

De toutes ces observations, de l'expériences des praticiens, sont nées un grand nombre de modifications de détail dans l'application de la méthode; mais l'emploi du sérum non chauffé est devenu maintenant d'application tout à fait générale, parce que, devant les résultats obtenus les opérateurs exercés, lui reconnaissent une sensibilité plus grande que celle du sérum chauffé (3).

(1) Joltrain. Nouvelles méthodes de séro diagnostic.

(2) *C. R. Soc. biol.*, 10 nov. 1917, t. LXXX, p. 814.

(3) Rabinowitch. *Bulletin Instit. Pasteur*, 15 juillet 1914, t. XII, p. 592. Latapie, Joltrain, etc.

Nos recherches étaient déjà commencées lorsque nous avons eu connaissance des travaux publiés par Rubinstein (1) et par Gradwoll, de Saint-Louis. Dans ses réactions au sérum non chauffé, Gradwoll a tenu compte de l'index hémolytique naturel de chaque sérum en proportionnant les globules au pouvoir hémolytique.

« La réaction ainsi conduite, dit-il (2), se montre souvent positive, alors que le Wassermann classique est négatif, en particulier dans les cas de syphilis oculaire ou viscérale et dans les cas de traitement intensif défectueux. Quand un traitement vigoureux fait disparaître la réaction positive obtenue par cette méthode, il est rare de la voir réapparaître ».

Ces conclusions sont absolument conformes aux résultats de nos observations : l'application de l'index hémolytique, déjà proposée par Rubinstein (3) après Weinberg, Busila, Hallion et Bauer, etc., évite certaines causes d'erreur, dues aux hématies de mouton, ainsi qu'à la répartition inégale des hémolysines dans le sérum ; de plus, elle augmente encore la sensibilité de la réaction au sérum non chauffé.

Mais le but que nous avons poursuivi consistait, non seulement à demander à la réaction toute la rigueur et la sensibilité possibles, mais encore à préciser le sens et la valeur des résultats douteux ou faiblement positifs.

Nous croyons avoir atteint ce but par l'étude comparative de la durée d'hémolyse dans les tubes à antigène avec le temps nécessaire à l'hémolyse totale dans le tube témoin.

A cet effet, nous employons, pour chaque sérum, une

(1) *C. R. Soc. biol.*, 20 janvier 1917, t. LXXX, p. 71.

(2) *Journ. of. Amer. Med. Ass.*, 17 février 1917, p. 514.

(3) *C. R. Soc. biol.*, 20 janvier 1917, t. LXXX, p. 71.

quantité de globules telle que l'hémolyse totale, dans le dernier acte de la réaction, soit produite dans le tube témoin dans un temps déterminé, que de nombreuses expériences nous ont permis de fixer à dix minutes environ.

Avant d'entrer dans le détail de la technique, édifiée sur ces bases, et appuyée sur les observations déjà citées, ainsi que sur nos recherches personnelles, nous étudierons successivement les éléments qui entrent en jeu dans la réaction: sérum, antigène et système hémolytique.

LE SERUM

Prélèvement du sang. — La ponction veineuse, avec une simple aiguille à biseau court de 5 à 8 dixièmes de millimètres de diamètre est, de beaucoup, la manière la plus pratique de faire le prélèvement.

On reçoit le sang dans un tube à essai stérile jusqu'à mi-hauteur. On bouche le tube et on l'abandonne dans une position très inclinée. On peut le redresser ensuite après coagulation.

La prise de sang, par ventouse scarifiée, ne doit être employée qu'exceptionnellement, lorsque la ponction veineuse n'est pas possible, parce qu'elle exige des manipulations au cours desquelles il est difficile d'éviter quelque souillure.

Dans tous les cas, il est de la plus grande importance que tous les instruments employés soient parfaitement secs. La moindre trace d'humidité peut provoquer une hémolyse partielle qui laquerait le sérum et troublerait la réaction finale; de plus, l'autolyse du sang annihile le pouvoir hémolytique naturel du sérum vis-à-vis des globules d'animaux, sans doute par disparition du complément.

En vue d'éviter la présence de tout antiseptique qui pourrait être nuisible, le nettoyage de la peau avant la piqûre doit être fait exclusivement à l'alcool fort ou à l'éther. La teinture d'iode ne sera employée qu'après le prélèvement.

Il faut se souvenir enfin que, pendant les premiers mo-

ments de la digestion, surtout après un repas copieux, le sang est chylifère et fournit un sérum lactescent. Un tel sérum rend souvent l'appréciation du résultat de la réaction fort difficile. Certains auteurs en proscrivent même l'examen d'une manière absolue.

Séparation du sérum. — Le sérum se sépare presque toujours facilement du caillot, surtout lorsque celui-ci s'étant formé dans un tube très incliné, laisse un vide entre sa surface libre et la paroi latérale du tube. Lorsque la séparation se fait mal ou ne se fait pas, on l'active en détachant avec une longue aiguille stérile la partie supérieure du caillot de la paroi du tube et l'on abandonne au repos.

On isole ensuite le sérum ainsi obtenu, qui est presque toujours limpide, en le versant délicatement dans un tube de faible diamètre, stérilisé.

Un repos d'une nuit permettra aux quelques débris entraînés, de se déposer au fond du tube. Cette décantation par le repos, qui se fait parfaitement du reste, nous semble nettement préférable à la centrifugation. Elle offre, en effet, toute garantie de respect de la constitution moléculaire ou colloïdale de certaines substances actives du sérum encore si peu connues, dont le rôle peut être d'une réelle importance dans la déviation du complément.

Nous avons ainsi constaté plusieurs fois qu'un même sérum provoquait des retards d'hémolyse sensibles s'il était employé immédiatement après centrifugation, tandis qu'il fournissait une réaction négative franche après avoir été simplement clarifié par le repos, puis décanté.

Conservation du sérum. — Le sérum recueilli dans des conditions d'asepsie parfaite, peut se conserver fort longtemps. Il en est ainsi pour les sérums antimicrobiens journellement employés en thérapeutique.

Mais, dans la pratique courante, il n'est pas toujours possible de conduire les opérations de prélèvement d'une manière aussi rigoureusement aseptique que dans les laboratoires. En fait, nous n'avons observé que très exceptionnellement, sur un grand nombre de sérums de toute provenance, une souillure ou une altération suffisantes pour empêcher leur étude, même après un séjour d'une semaine en été dans le laboratoire.

Combien de temps après le prélèvement convient-il d'examiner le sérum?

Par analogie avec la valeur curative des sérums thérapeutiques, il est permis d'admettre que le sérum syphilitique peut conserver pendant longtemps son pouvoir spécifique. Mais on sait aussi que les propriétés des anticorps s'atténuent avec le temps, et lorsque ceux-ci n'existent qu'en petite quantité, le vieillissement du sérum risquerait de les faire disparaître.

D'autre part, on a signalé des causes d'erreur dans un sens ou dans l'autre provoquées par l'emploi de sérums trop frais.

Mandelbaum (1) a remarqué la présence, dans certains sérums très frais, de substances anticomplémentaires qui auraient pour effet d'atténuer plus ou moins fortement, sinon d'empêcher la manifestation d'une réaction négative. Mandelbaum, qui tient à l'emploi du sérum frais, propose de supprimer cette cause d'erreur en chauffant le sérum après l'avoir dilué avec de l'eau physiologique. Mais il reconnaît aussi que ces substances anticomplémentaires, lorsqu'elles existent dans le sérum frais, disparaissent d'elles-mêmes ou sont très atténuées par un vieillissement de vingt-quatre ou quarante-huit heures.

(1) *Munch. med. Woch*, 12 mars 1918, p. 294.

Telmon (2) signale de son côté que certains sérums peuvent produire, s'ils sont trop frais, une hémolyse trop rapide des globules et donner, au contraire, quoique positifs, une réaction douteuse ou même négative. Il attribue cette cause d'erreur possible à un excès de complément qu'il propose d'atténuer par le chauffage. Le titrage du pouvoir hémolytique naturel du sérum, tel que nous le pratiquons, doit éliminer cette cause d'erreur; mais on ne la rencontre jamais avec des sérums vieux de quarante-huit heures.

Joltrain, qui a mis au point une méthode au sérum non chauffé, recommande de n'étudier les sérums qu'après un séjour de quarante-huit heures à la glacière.

Mais il convient de se souvenir aussi que le pouvoir hémolytique naturel du sérum s'atténue lui-même assez vite, et si l'on veut l'utiliser pour la réaction, il est nécessaire de ne point retarder l'examen au-delà de trois ou quatre jours après le prélèvement.

Pour ce qui nous concerne, lorsque le sang arrive au laboratoire, dans le tube même qui a servi à le recueillir peu d'heures auparavant, nous l'abandonnons à la température ordinaire jusqu'au soir du deuxième jour. Le sérum est alors décanté dans un tube stérile de faible diamètre et mis au repos dans un endroit frais pendant toute la nuit.

Le lendemain, les particules et les globules entraînés sont déposés au fond du tube, et le sérum, très limpide, est prêt à être examiné.

(2) *Presse médicale*, 19 juillet 1917, p 411.

L'ANTIGÈNE

L'antigène est le pivot de toutes les réactions de déviation du complément. Lorsque la culture du microbe est possible, c'est cette culture même qui est employée, ce qui permet de considérer la toxine comme substance active exclusivement spécifique. Il en est ainsi pour la coqueluche, la typhoïde, etc. Dans le cas particulier de la syphilis, à défaut de la culture *in vitro* du tréponème, Wassermann avait eu l'idée d'employer, pour obtenir la déviation du complément, un extrait de foie d'hérédo-syphilitique, cet organe se trouvant riche en tréponèmes. Mais on ne tarda pas à obtenir le même résultat avec l'extrait de foie normal (Armand Delille), de cœur ou d'autres viscères (Levaditi, Noguchi, etc.), et même avec des antigènes complètement artificiels à base d'oléate de soude (Sachs) et de cholestérine (Desmoulières).

Ces antigènes sont-ils absolument spécifiques de la syphilis? De très nombreuses expériences montrent bien qu'ils dévient le complément des sérums syphilitiques et demeurent inactifs avec le sérum des sujets sains. On a cependant reconnu que la déviation se produit aussi parfois dans la lèpre et la scarlatine, mais non, comme certains l'avaient avancé, dans la malaria.

Cet inconvénient serait grave si, dans ces quelques cas particuliers, la réaction positive n'était accompagnée de

signes cliniques tels que l'observateur prévenu ne peut pas ne pas les attribuer à leur véritable cause.

Sauf ces exceptions qu'il faut connaître, mais dont le nombre diminue encore à mesure que de nouveaux détails de technique rendent la réaction plus précise et plus sensible, on peut considérer que les résultats obtenus par l'emploi de ces antigènes sont pratiquement caractéristiques de la syphilis.

Dans tous les cas, l'antigène doit être l'objet d'un examen rigoureux. Il est nécessaire de s'assurer, à chaque série d'opérations, non seulement de son pouvoir de fixation, mais aussi de ses facultés anticomplémentaires ou hémolytiques propres, au moyen de tubes témoins qui peuvent d'ailleurs être uniques pour chaque groupe d'essais.

En fait, il est rare d'examiner à la fois plusieurs sérums qui soient tous de même signe, et la présence simultanée de réactions positives et de réactions négatives franches dans une même série peut suffire comme garantie de la valeur de l'antigène.

Il va de soi que l'antigène doit avoir été très soigneusement préparé ou provenir d'une origine sûre. Il est avantageux qu'il soit de titre fort, c'est-à-dire qu'il doive être dilué pour son emploi avec plus de vingt fois de son volume d'eau salée, de manière à éviter l'influence, qui pourrait être sensible dans la réaction, du solvant alcoolique ou étheré qui lui sert de véhicule.

Nous avons employé concurremment l'extrait alcoolique de foie d'hérédo-syphilitique et un antigène lipoïdique préparé selon la formule de Noguchi, sans avoir remarqué de différences sensibles dans les résultats.

Plusieurs auteurs ont signalé que l'antigène présentait parfois, au contact de certains sérums négatifs, un pouvoir anticomplémentaire qui retardait ou pouvait même empê-

cher l'hémolyse. Nous avons vérifié l'exactitude de cette assertion, et c'est afin de préciser les cas où se produit cette déviation partielle du complément, d'intensité naturellement proportionnelle à la quantité d'antigène, que nous nous sommes attaché à l'étude des rapports entre le temps nécessaire pour obtenir l'hémolyse totale dans le tube témoin et cette durée d'hémolyse dans les autres tubes contenant des doses d'antigène progressivement croissantes

LE SYSTEME HEMOLYTIQUE

L'hémolyse est constituée par la disparition, sous une influence adéquate, du substratum des globules rouges et la mise en liberté de l'hémoglobine qui se dissout dans le liquide en le colorant.

Tel est l'indicateur, grâce auquel on peut apprécier le sens de la déviation du complément.

Le système hémolytique employé dans ce but est formé, d'après les théories actuelles, de trois éléments: les globules, l'hémolysine spécifique pour ces globules, et enfin, l'alexine ou complément, ce même complément qui, dans la réaction, peut être fixé sur l'antigène par la sensibilisatrice et dont il s'agit, en l'espèce, de constater la présence ou la disparition.

Les globules. — Dans la pratique d'une réaction qui doit être d'autant plus méticuleusement conduite que les facteurs en sont moins connus, il n'est point de détails inutiles. Aussi convient-il de rappeler comment doivent être préparés et employés les globules, dont le rôle est d'une importance tout aussi grande que celle des autres éléments.

Soit qu'on prélève le sang de l'animal par ponction veineuse, soit qu'on le recueille directement à l'abattoir dans un ballon stérile contenant des perles de verre et qu'on le défibrine par agitation, on doit séparer les globules du

plasma par centrifugation, puis les laver deux fois à l'eau salée à 9 p. 1000.

Il faut éviter une trop grande vitesse (3.000 tours) de même qu'une trop longue durée de centrifugation qui altèrent les globules ou les agglomèrent en petites masses souvent visibles à l'œil nu.

Ces agglomérats se prêtent mal au lavage et surtout à la dilution, qui, dès lors, ne peut plus être parfaitement homogène. De plus, les globules trop fortement centrifugés sont plus résistants à l'hémolyse. La purée de globules lavés restant au fond du tube après la dernière décantation est ramenée pour l'usage au volume primitif du sang par addition d'eau salée stérile à 9 p. 1000.

Il est préférable de se servir de globules frais; mais on peut les conserver pendant huit jours et plus par l'excellent procédé de MM. Armand Delille et Launoy, qui consiste à les additionner de formol dans la proportion de 1 p. 500 de leur volume.

On ne saurait trop attirer l'attention sur l'homogénéité des dilutions globulaires. Elle se détruit, en effet, facilement et rapidement par la tendance qu'ont les globules à tomber à la partie inférieure du récipient ou de la pipette. On doit donc, au moment de les utiliser, agiter soigneusement et mesurer vite, ce qui n'exclut pas la précision.

L'hémolysine et le complément. — Nous sommes encore ici dans le domaine de l'hypothèse. L'hémolysine et le complément n'ont jamais été isolés. On sait qu'ils ne peuvent agir l'un sans l'autre, mais leur différence n'est démontrée que par la résistance de la première et la disparition de l'autre à la température de 56°. Il est, en effet, troublant de constater que l'excès de l'un peut, dans une assez large mesure, compenser le déficit de l'autre (Vernes, Noguchi,

Gérard, etc.). Mais en attendant plus de précision, nous devons bien admettre la théorie première proposée par Bordet, de l'existence de ces deux éléments et de leur action réciproque ; théorie empirique, mais dont le mérite est d'ailleurs très grand d'avoir permis les applications pratiques dont nous étudions ici la principale.

L'hémolysine est donc cette substance, albumineuse sans aucun doute, ferment peut-être, qui, se fixant sur le globule, est capable, avec l'adjonction nécessaire du complément, d'en détruire le substratum et de mettre en liberté l'hémoglobine.

Les sérums d'animaux, comme le sérum humain, possèdent, à des degrés variables, des hémolysines naturelles vis-à-vis des globules d'animaux de races différentes. Mais on peut augmenter artificiellement la puissance de ces hémolysines ou même en provoquer la formation, par des injections répétées de globules d'animaux vis-à-vis desquels on désire activer le sérum. C'est là, du reste, une opération longue et délicate, qui est indispensable pour la réaction de Wassermann primitive, mais que l'utilisation de l'hémolysine naturelle du sérum humain permet de supprimer.

Le complément existe dans tous les sérums, à des degrés variables, comme l'hémolysine, mais il existe toujours dans le sérum humain (1).

Esbach et Duhot (2) affirment même que, dans la plupart des cas, la proportion d'alexine naturelle du sérum dépasse la quantité nécessaire aux sensibilisatrices naturelles pour produire leur maximum d'hémolyse.

Sur un grand nombre de sérums isolés par coagulation normale, Dopter n'en a trouvé que 3 p. 100 ayant perdu

(1) Bénard. *C. R. Soc. biol.*, 23 mars 1918, t. LXXXI, p. 281.

(2) *C. R. Soc. biol.*, 8 juin 1918, t. LXXXI, p. 570.

complètement leur alexine. Il est d'ailleurs facile, en telle occurrence, de donner au sérum étudié le complément qui lui manque au moyen d'un autre sérum humain qu'on choisira, bien entendu, parmi ceux reconnus franchement négatifs pour la réaction spécifique envisagée. On supprimera ainsi l'intervention du sérum de cobaye qui, dans de telles conditions, n'est nullement indispensable.

Mais, en revanche, cette suppression de l'hémolysine et du complément artificiels titrés rendent absolument obligatoires l'étude et le dosage du pouvoir hémolytique naturel du sérum humain soumis à l'expérience.

Il est, en effet, reconnu que, dans un système hémolytique équilibré de telle manière que l'hémolyse soit produite dans un temps donné, toute variation dans les quantités de l'un des éléments en présence entraîne une variation correspondante de la durée de l'hémolyse dans les mêmes conditions de température et de dilution.

MESURE DU POUVOIR HEMOLYTIQUE NATUREL DU SÉRUM HUMAIN

Prenons un sérum humain possédant un pouvoir suffisant pour hémolyser complètement, à la température de 37°, en trente minutes, par exemple, trois fois son volume de dilution à 10 p. 100 de globules de mouton.

Préparons six tubes de la manière suivante:

	I	II	III	IV	V	VI
	cc.	cc.	cc.	cc.	cc.	
Eau salée ..	0,25	0,20	0,15	0,10	0,05	0
Sérum	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Globules . . .	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30

Agitons et mettons ces tubes à l'étuve à 37°.

En suivant attentivement la réaction, nous verrons que l'hémolyse totale jusqu'à limpidité parfaite est obtenue dans des temps dont la progression, si elle n'est pas exactement proportionnelle à la quantité des globules, suit une courbe dont on remarque l'allure constante pour tous les sérums, et qui peut se traduire, dans l'exemple donné, par les temps suivants:

Tubes	I	II	III	IV	V	VI
Durée	3'	5'	8'	12'	18'	30'

Il est très important d'observer, et nous insisterons plus loin sur ce fait, que, si nous augmentons progressivement la quantité de globules, la courbe de puissance hémolytique s'infléchit rapidement pour atteindre bientôt un point tel qu'il ne se produit plus aucune hémolyse, même partielle, avec un sérum cependant doué d'un pouvoir hémolytique manifeste.

Si, d'autre part, nous atténuons la puissance d'une partie du sérum précédent en le plaçant à l'étuve à 37° pendant un certain temps et que nous recommencions l'épreuve en présence d'un tube témoin contenant les mêmes volumes de globules et de sérum normal, nous constaterons que le temps nécessaire pour obtenir l'hémolyse totale sera nettement plus long pour le sérum étuvé et d'autant plus long que le séjour à l'étuve aura été plus considérable.

ETUDE DU POUVOIR HEMOLYTIQUE NATUREL
DU SERUM HUMAIN
VIS-A-VIS DES GLOBULES DE QUELQUES ANIMAUX

A la suite des travaux de Hecht et de Noguchi sur la présence et l'utilisation des hémolysines et du complément naturels du sérum humain, divers expérimentateurs ont cherché à déterminer la fréquence et la valeur du pouvoir hémolytique vis-à-vis des globules de quelques animaux.

Ottemberg et Frazier (1) ont trouvé que, sur 2.158 sérums 995, soit 44 p. 100 contenaient une quantité appréciable d'ambocepteur naturel vis-à-vis des globules de mouton et que 476, soit 21 p. 100, en refermaient suffisamment pour déterminer un laquage total sans addition d'hémolysine spécifique.

Kolmer et Kasselmann (2) ont donné une statistique plus complète puisqu'elle porte sur les globules de dix espèces d'animaux différentes, mais avec un nombre de sérums beaucoup moins grands.

Ils ont obtenu les résultats ci-après :

Nombre de sérums étudiés	Globules de	Hémolyse totale ou partielle	Hémolyse nulle
125	Mouton	93 0/0	7 0/0
85	Bœuf	50 0/0	50 0/0
25	Cheval	4 0/0	96 0/0
25	Lapin	4 0/0	96 0/0

(1) *Journ. of. inf. dis.*, mars 1915, t. XVI, p. 119.

(2) *Journ. of. inf. dis.*, mai 1915, t. XVI, p. 441.

Esbach et Duhot (1) ont étudié de leur côté le pouvoir hémolytique des sérums humains frais sur les globules de mouton et de lapin.

Prenant comme unité globulaire III gouttes normales de suspension à 5 p. 100 de globules frais déplasmatisés, lavés et ramenés au volume primitif, ils ont ajouté à 0 cc. 1 de sérum humain frais (6 heures), placé à l'étuve à 37°, d'abord une unité globulaire, puis ils renouvelaient cette addition dès que l'hémolyse de la dose précédente était obtenue. La réaction était poursuivie pendant un temps variable avec chaque sérum et pouvait atteindre trois heures avec certains d'entre eux jusqu'à ce que la dernière dose ne soit plus hémolysée.

Ils ont ainsi constaté que tous leurs sérums (600) pouvaient hémolyser les globules de lapin, tandis que 8 p. 100 se montraient réfractaires vis-à-vis des globules de mouton.

Les résultats obtenus par Esbach et Duhot et ceux indiqués par Kolmer et Kasselmann sont comparables, en ce qui concerne les globules de mouton, soit 92 et 93 p. 100 de sérums hémolytiques, c'est-à-dire deux fois plus que ne l'ont dit Ottenberg et Frazier; mais tandis que les premiers ont trouvé, dans tous leurs sérums, des hémolysines naturelles pour les globules de lapin, les seconds signalent une énorme proportion de 96 p. 100 de sérums non hémolytiques.

En face de ces divergences, il nous a semblé nécessaire de poursuivre et de préciser ces recherches à cause du rôle essentiel des hémolysines naturelles dans la méthode que nous envisagions pour la détermination de la déviation du complément.

(1) *C. R. Soc. biol.*, 8 juin 1918, t. LXXXI, p. 566.

Ayant mis à profit le voisinage immédiat des abattoirs de Montpellier pour nous procurer, dans les meilleures conditions, du sang d'animaux de boucherie, nous avons étudié dans plusieurs séries d'expériences le pouvoir hémolytique naturel d'un grand nombre de sérums humains sur les globules de ces animaux.

Nous avons envisagé toutes les conditions pouvant apporter la plus grande précision possible à cette étude et pris en considération tous les éléments détaillés ci-après :

- 1° Ancienneté du sérum depuis la prise de sang ; conditions de conservation ;
- 2° Ses caractères organoleptiques : limpidité, couleur ;
- 3° Âge des globules ; taux de leur dilution ;
- 4° Nature, âge et sexe de l'animal ;
- 5° Temps nécessaire pour obtenir l'hémolyse totale à 37°.

On sait, en effet, pour ce qui concerne ce dernier point que l'hémolyse est plus rapide si l'on élève la température jusqu'à 39° et 40°.

Nos expériences ayant été poursuivies pendant plus d'une année, les sérums conservés à la température du laboratoire se sont trouvés dans des conditions assez différentes, de même que les globules, lorsque ceux-ci ont été employés à plusieurs séries d'essais.

Il ne nous a pas semblé que la diversité de ces conditions de conservation des globules, non plus que le taux de leur dilution aient provoqué des modifications sensibles dans les résultats obtenus. Sans doute, la résistance globulaire semble s'accroître avec l'âge du sujet, sans doute aussi avec l'état de rut. Nous signalons pour mémoire ces deux observations recueillies au cours de nos travaux. Mais en ce qui concerne le sérum, son ancienneté tient au contraire un rôle

de grande importance, car il n'est pas douteux que le pouvoir hémolytique naturel s'affaiblit assez rapidement. En outre, nous avons cru remarquer que l'agitation, le transport atténuent également ce pouvoir hémolytique. Par contre, la teinte plus ou moins accentuée du sérum nous a paru tout à fait indifférente.

Ces premières séries d'expériences ont porté sur 263 sérums, dont 70 ont été examinés plusieurs fois, à quelques jours d'intervalle. Nous avons ainsi constaté que le pouvoir hémolytique naturel peut se conserver dans bien des cas beaucoup plus longtemps qu'on ne l'a dit jusqu'ici. La plupart de nos sérums présentaient encore après cinq, huit et même dix jours, un pouvoir hémolytique appréciable.

Nous résumons ci-dessous les résultats obtenus avec les sérums âgés de un à trois jours, en considérant comme hémolytiques ceux dont un volume de 0 cc. 1 a pu provoquer en moins de 30 minutes, à 37°, l'hémolyse totale de 0 cc. 1 de dilution globulaire à 1 p. 10 :

Nombre d'animaux ayant fourni les globules	Nombre de sérums examinés	Sérums hémolytiques	Sérums non hémolytiques
30 moutons	214	97 0/0	3 0/0
7 lapins	37	99 0/0	1 0/0
4 chevaux	24	21 0/0	79 0/0
11 bovidés	72	53 0/0	47 0/0

Les globules de chevaux et de bovidés (bœufs, vaches et veaux) se sont montrés presque toujours trop résistants aux hémolysines naturelles pour être employés pratiquement et d'une manière courante dans la réaction de déviation du complément. Aussi n'avons-nous pas tardé à abandonner les recherches entreprises sur les globules de ces animaux. Avec les lapins, nous avons obtenu des résultats analogues à ceux d'Esbach et Duhaut; mais en raison de la

facilité que nous avons de nous procurer du sang frais de mouton, c'est sur les globules de cet animal que nous avons poursuivi le plus assidûment nos recherches. Ces moutons étaient tous de race indigène (Causse, Cévennes et Languedoc), et âgés de deux ans environ.

Les sérums étudiés provenaient en grande majorité du Centre syphilitique de la XVI^e Région. C'est dire que beaucoup d'entre eux (40 p. 100) donnaient une réaction de Wassermann positive.

Les réactions d'essais étaient disposées de la manière suivante :

Tubes n°.....	I	II	III	IV	V	VI
Sérum	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Eau salée à 9 0/00....	0,25	0,20	0,15	0,10	0,05	0,
Globules à 10 0/0.....	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30

Les tubes contenant le sérum et l'eau salée étaient mis à l'étuve à 37° pendant 30 minutes, puis on y ajoutait les globules portés eux-mêmes rapidement à 37° au bain-marie. L'introduction des globules et le mélange étaient faits aussi vite que possible, afin d'éviter le refroidissement. On remettait à l'étuve et l'étude de l'hémolyse était poursuivie pendant une heure.

Cette manière d'opérer, un peu particulière à première vue, se justifiait par le but que nous poursuivions : détermination du pouvoir hémolytique naturel du sérum en vue de la pratique de la réaction de Wassermann au sérum non chauffé basée sur la durée d'hémolyse.

Nous avons pu suivre ainsi l'allure de la courbe de ce pouvoir hémolytique naturel dont nous avons parlé plus haut. Il est de toute première importance de savoir que, si l'on dépasse même légèrement le taux de globules le plus

élevé qui puisse être hémolysé en trente minutes, l'hémolyse devient brutalement nulle. Il est donc nécessaire, pour éviter des erreurs de diagnostic, de se tenir suffisamment au-dessous de ce taux dans la réaction de déviation du complément.

C'est pour cette raison, confirmée par l'expérience, que nous avons fixé à dix minutes seulement la durée-type de l'hémolyse totale dans le tube témoin.

Par contre, ainsi que l'a signalé Telmon (1), une durée-type inférieure à cinq minutes, peut occasionner, dans certains cas, une erreur de diagnostic dans un sens différent.

Afin de ne point nous écarter du point de vue pratique, nous résumerons nos observations dans un seul tableau.

Voici donc, en ce qui concerne les 214 sérums dont nous avons parlé, prélevés depuis moins de cinq jours, et les globules de 30 moutons différents, les quantités de dilution de globules à 1 p. 10 que nous avons employées pour obtenir l'hémolyse totale à 37° dans le temps compris entre sept et dix minutes avec 0 cc. 1 de sérum :

5 sérums ont hémolysé 0 cc. 30 de dilution globulaire					
16	—	—	0 cc. 25	—	—
31	—	—	0 cc. 20	—	—
53	—	—	0 cc. 15	—	—
65	—	—	0 cc. 10	—	—
38	—	—	0 cc. 50	—	—

6 sérums n'ont pu produire avec 0,05 qu'une hémolyse partielle.

On voit que 97 p. 100 des sérums normaux ont pu présenter un pouvoir hémolytique naturel suffisant pour la réaction de Bordet-Wassermann.

(1) *Presse médicale*, 49 juillet 1917, p. 411.

Depuis ces expériences, nous avons eu l'occasion d'examiner, dans le même sens encore, plus de 1000 sérums (1) nouveaux qui nous ont donné des résultats absolument analogues.

Il est aisé d'activer les rares sérums dépourvus du pouvoir hémolytique naturel nécessaire à la réaction, de même que le liquide céphalo-rachidien, qui, lui, n'est jamais naturellement hémolytique.

Il suffit pour cela de leur ajouter un peu de sérum normal, reconnu franchement négatif. Cet artifice est signalé par Tribondeau (2), Rubinstein (3), etc., et nous l'avons mis en pratique avec avantage.

Sellards et Minot qui ont étudié l'action réciproque des sérums ainsi mélangés (4), ont, à vrai dire observé que ceux donnant une réaction de Wassermann négative étaient en général doués de quelque pouvoir inhibant pour les sérums à réaction positive. Ils reconnaissent toutefois que ce pouvoir est assez faible. En fait, nous n'avons jamais constaté que son intervention pût changer le signe de la réaction, mais il faut pour cela n'ajouter de cet adjuvant que le minimum nécessaire.

(1) Exactement 1087, du 1^{er} octobre 1917 au 31 mars 1919.

(2) *C. R. Soc. biol.*, 16 juin 1917, t. LXXX, p. 582

(3) *C. R. Soc. biol.*, 20 janvier 1917, t. LXXX, p. 72.

(4) *Journ. of. med. res.*, mai 1916, t. XXXIV, p. 131.

TECHNIQUE DE LA REACTION

La pratique de la réaction comprend deux phases.

On titre, dans une première opération, le pouvoir hémolytique naturel du sérum humain vis-à-vis des globules du jour. On détermine ainsi le volume de ces globules que le sérum est susceptible d'hémolyser dans le temps compris entre sept et dix minutes. Ce volume Q. S. étant ainsi fixé, on procède à la réaction définitive.

A. Détermination du volume Q. S. de dilution globulaire.

— Les tubes (de 8 millim. $\times$ 160) sont disposés de la manière suivante :

Tubes n°.....	I	II	III	IV
	cc.	cc.	cc.	cc.
Eau salée à 9 0/00.	0,15	0,15	0,15	0,15
Sérum	0,1	0,1	0,1	0,1

On agite et place le tout à l'étuve à 37°-38° pendant une demi-heure au cours de laquelle on mélange encore une fois.

On ajoute alors aux quatre tubes contenant le sérum, respectivement 0 cc. 05, 0 cc. 10, 0 cc. 20 et 0 cc. 30 de dilution globulaire à 10 p. 100, bien homogène, et qui aura été au préalable, rapidement portée à 37° au bain-marie.

On mélange avec soin, on note la minute, et le tout est remis à l'étuve à 37°-38°.

Après sept minutes, on note le dernier tube dans lequel le liquide est parfaitement limpide, par suite de l'hémolyse complète.

Après dix minutes, nouvelle constatation qui permet de fixer le volume de dilution globulaire à employer pour la réaction finale.

On peut poursuivre l'opération, mais les sérums n'ayant pas fourni d'hémolyse totale dans le premier tube (avec 0 cc. 05 de globules) en quinze minutes au maximum, devront être renforcés.

B. *Réaction proprement dite.* — On dispose ainsi une nouvelle série de quatre tubes :

Tubes n°....	I	II	III	IV
	cc.	cc.	cc.	cc.
Eau salée	0,15	0,10	0,05	0,15
Sérum	0,10	0,10	0,10	»
Antigène	»	0,05	0,10	0,10

On mélange, et on met à l'étuve à 37°-38° pendant une demi-heure, au cours de laquelle on agite encore une fois.

On introduit alors rapidement dans chacun des tubes le volume Q. S. exactement mesuré, déterminé par le premier essai, de dilution globulaire bien homogène et tiédie comme ci-dessus. Agiter, noter la minute et replacer à l'étuve à 37°-38°.

Il faut alors, à partir de la sixième minute, suivre attentivement l'hémolyse et déterminer exactement le temps nécessaire pour obtenir la limpidité parfaite dans le tube I

qui est le témoin, puis, s'il y a quelque retard, dans les tubes à sérum + antigène.

Le tube IV (épreuve de l'antigène) ne doit pas être hémolysé.

Il est commode, mais non indispensable, d'employer pour cette opération, une étuve dont deux parois opposées sont transparentes.

INTERPRETATION DES RESULTATS

Nous allons envisager successivement les cas typiques qui peuvent se présenter et auxquels se rattachent toutes les observations lorsque l'expérience a été conduite avec toute la précision désirable, surtout dans le dosage des éléments de la réaction.

Tubes :		I	II	III
		(témoin)	(antig. 0,05)	(antig. 0,10)
		Durée d'hémolyse en minutes :		
1 ^{er} cas.	Exemple :	9'	9'	16'
2 ^e cas		10'	26'	40'
3 ^e cas		9'	24'	26'
4 ^e cas		13'	H. Part	H. Part
5 ^e cas		9'	H. Part	H. Nulle
6 ^e cas		12'	H. Nulle	H. Nulle

PREMIER CAS. — *L'hémolyse totale se produit dans les trois tubes sensiblement dans le même temps : types 9, 9, 10 et 12, 13, 14 : = Réaction négative.*

DEUXIÈME CAS. — *L'hémolyse totale est nettement retardée dans les tubes à antigène. Ce retard est sensiblement proportionnel aux quantités d'antigène : types : 10', 26', 40' : = Réaction négative.*

De nombreuses expériences nous ont permis de constater de tels retards avec un certain nombre de sérums de malades cliniquement non syphilitiques et sans antécédents.

Ainsi que nous l'avons dit plus haut, ces retards paraissent dus au pouvoir anticomplémentaire acquis dans ces conditions par l'antigène et sont naturellement proportionnels aux quantités de ce réactif.

Les retards d'hémolyse de cet ordre peuvent être quelquefois considérables. Lorsqu'ils dépassent 10' — 40' — 60', et le fait se produit, cela peut être, pour un opérateur non prévenu, une cause d'erreur dans la conclusion. L'observation du retard dans les tubes à antigène, telle que nous l'indiquons ne permet pas le moindre doute sur le sens de la réaction.

TROISIÈME CAS. — *Le retard est sensiblement le même dans les deux derniers tubes et indépendant des quantités respectives d'antigène, types: 9, 24, 26 et 10 — 42 44 = Réaction spécifique; l'intensité de l'infection est en raison directe du retard.*

Ici la proportion d'antigène n'est plus en cause, car il s'en trouve toujours une quantité suffisante, même dans le tube qui en contient le moins, pour fixer la totalité de la sensibilisatrice spécifique, qui n'existe qu'à faible dose dans le sérum.

L'absorption d'une partie seulement du complément total par cette petite quantité de sensibilisatrice, devient la cause du retard de l'hémolyse. Le retard sera donc indépendant de la quantité d'antigène, mais proportionnel au taux de la sensibilisatrice du sérum. Par suite, dans une même réaction faiblement positive, les retards d'hémolyse doivent être sensiblement les mêmes dans les tubes à antigène, et non plus, comme précédemment, variables avec le taux de ce réactif.

Nous avons observé de tels retards à tous les degrés, en période croissante chez les syphilitiques au début, en

période décroissante au cours du traitement, avec une intensité plus ou moins grande chez les hérédosyphilitiques et les anciens contaminés. En particulier, dans les deux dernier cas, nous avons pu confirmer avec précision un certain nombre de diagnostics que l'examen clinique ou les antécédents permettaient seulement de supposer.

Partant du type 10 — 30 — 30 —, au-dessous duquel il convient de laisser une marge pour les causes d'erreur, on trouve, avant d'atteindre l'hémolyse nulle, caractéristique de la réaction franchement positive, tous les termes de passage marquant le degré d'intensité de l'infection.

C'est l'échelle de Vernes, mais exprimée en durée et plus détaillée, et qui présente en outre l'avantage de séparer les retards d'hémolyse spécifique de ceux qui ne sont pas dus à la syphilis.

On peut ainsi suivre pas à pas l'invasion du mal ou les effets du traitement.

Les expressions de retard : 10 — 35 — 35 ; 10 — 50 — 50, donneraient au médecin traitant des indications plus précises que celles fournies par la simple conclusion de réaction faiblement positive encore généralement adoptée.

QUATRIÈME ET CINQUIÈME CAS. — *L'hémolyse totale ne se produit pas en une heure dans les tubes à antigène, mais elle est partielle dans l'un ou dans les deux.*

Le fait est assez rare lorsqu'il n'y a pas syphilis, mais il peut se produire. Dans plusieurs cas de ce genre nous avons pu dépister la non-spécificité du sérum en recommandant l'expérience et diminuant du tiers ou de moitié la quantité (Q. S.) de globules ajoutés ou doublant le volume de sérum mis à l'épreuve. L'hémolyse étant plus rapide alors dans les trois tubes, on obtient un résultat analogue

aux types 5, 15 — 25 ou 6 — 30 — 30, qui se classent d'eux-mêmes dans le deuxième ou le troisième cas.

Il nous semble intéressant de rapporter deux exemples typiques de ce genre, rencontrés par hasard dans la même série :

Tubes :	A			B		
	I	II	III	I	II	III
Q. S. glob. = 0 ^{cc} .20	24'	H. Part	H. Part	10'	H. Part	H. Part
Q. S. glob. = 0 ^{cc} .15	14'	H. Part	H. Part	7'	45'	90'
Q. S. glob. = 0 ^{cc} .05	4'	14'	15'	4'	14'	39'

A s'en tenir à la première réaction, les deux sérums auraient pu être considérés comme positifs. Un nouvel essai, avec une moindre quantité de globules, nous a fait constater une différence qu'un troisième examen, effectué en diminuant encore le taux globulaire, nous a permis de préciser.

Le diagnostic clinique, connu seulement après l'analyse, est venu confirmer nos conclusions.

On peut remarquer par les deux exemples précédents que, lorsqu'on augmente la quantité de globules Q. S. dans plusieurs réactions successives avec le même sérum, les retards d'hémolyse ne suivent pas la même loi de proportion dans les tubes témoins et dans les tubes à antigène.

Nous avons constaté, d'une manière générale, que, si l'augmentation du taux des globules fait varier, par exemple, du simple au double, la durée d'hémolyse dans le tube témoin, le retard varie sensiblement du simple au quadruple dans les tubes à antigène. Les résultats ci-dessus sont des exemples de cette progression dont il est utile de connaître les termes pour classer les retards à la place qui leur convient.

Comme, dans la pratique de la réaction, l'hémolyse du tube témoin ne se produit pas toujours exactement en dix

minutes, nous donnerons une formule et un tableau permettant de calculer aisément, pour chaque cas, quelle serait la durée d'hémolyse dans les tubes à antigène en ramenant à dix minutes la durée d'hémolyse dans le tube témoin. Ceci revêt une réelle importance dans les cas d'infection légère ou lorsqu'il s'agit de suivre les progrès de la maladie ou les effets du traitement.

SIXIÈME CAS. — *Hémolyse d'une durée ne dépassant pas quinze minutes dans le tube témoin, complètement nulle après une heure dans les tubes à antigène* = Réaction franchement positive.

EN RÉSUMÉ :

La durée nécessaire pour obtenir l'hémolyse est :	sensiblement égale dans tous les tubes (tolérance jusqu'à 10' - 30' - 30') . . . R. NÉGATIVE —	
	Retardée dans les tubes à antigène Ces retards sont :	sensiblement proportionnels aux quantités d'antigène Ex. : 10' - 25' - 40'
		R. NÉGATIVE —
	sensiblement égaux dans les tubes à antigène. Ex. : 10' - 38' - 42'	
de 15 minutes au maximum dans le tube témoin et nulle après 1 heure dans les tubes à antigène		R. POSITIVE ++ (franchement)

TABLEAU DES FORMULES

permettant de calculer la durée d'hémolyse en prenant pour base la durée-type de 10' dans le tube témoin lorsque dans l'expérience cette condition n'est pas réalisée.

DA représente la durée d'hémolyse dans les tubes à antigène.

Durée de l'hémolyse du tube témoin dans l'expérience	Multiplieur la durée d'hémolyse du tube témoin par	Formule à appliquer aux tubes à antigène
4'	2,50	6,25 (DA - 4)' + 10'
5'	2	4 (DA - 5)' + 10'
6'	1,67	2,77 (DA - 6)' + 10'
7'	1,43	1,86 (DA - 7)' + 10'
8'	1,25	1,56 (DA - 8)' + 10'
9'	1,10	1,21 (DA - 9)' + 10'
10'	1	»
11'	0,90	0,80 (DA - 11)' + 10'
12'	0,83	0,70 (DA - 12)' + 10'
13'	0,77	0,60 (DA - 13)' + 10'
14'	0,70	0,50 (DA - 14)' + 10'
15'	0,67	0,45 (DA - 15)' + 10'
16'	0,63	0,40 (DA - 16)' + 10'
17'	0,59	0,35 (DA - 17)' + 10'
18'	0,56	0,31 (DA - 18)' + 10'
19'	0,53	0,28 (DA - 19)' + 10'
20'	0,50	0,25 (DA - 20)' + 10'

Ce tableau résulte de l'application de la formule suivante, à laquelle nous nous sommes arrêté après de nombreuses expériences :

$$x = (DA - DT) \left(\frac{DT}{10} \right)^2 + 10'$$

x = temps nécessaire pour obtenir l'hémolyse totale dans les tubes à antigène si l'hémolyse totale était obtenue en 10 minutes dans le tube témoin.

DT = Durée d'hémolyse (en minutes, observée dans le tube témoin.

DA = Durée d'hémolyse (en minutes, observée dans les tubes à antigène.

CONCLUSIONS

La valeur d'une méthode se mesure aux résultats. Elle est aussi fonction des difficultés d'application. La technique exposée ci-dessus, par le fait même qu'elle repose sur l'appréciation de la durée d'hémolyse, exige évidemment une précision plus grande que d'autres dans le dosage des éléments de la réaction.

Mais pour qui a l'habitude du laboratoire, elle est simple et rapide. En plus d'une sensibilité très grande, nous lui trouvons l'avantage d'éviter l'emploi de sérums étrangers au sérum humain, dont il n'est pas prouvé que la présence reste toujours sans effet.

Elle apporte enfin quelque précision, non seulement dans la gamme des réactions faiblement positives, mais surtout dans le diagnostic des cas douteux, en permettant de distinguer les déviations partielles du complément réellement spécifiques de celles qui sont dues à des causes étrangères.

Nous avons eu la satisfaction de voir les résultats de cette méthode et l'application de nos recherches consacrés par la confiance et l'approbation des médecins traitants du Centre syphilitique et des Hôpitaux de Montpellier qui ont bien voulu nous charger de leurs analyses.

TABLE DES MATIÈRES

	Pages
1. Généralités.....	5
2. Choix de la méthode.....	8
3. Le sérum.....	13
4. L'antigène.....	17
5. Le système hémolytique.....	20
6. Mesure du pouvoir hémolytique naturel du sérum humain.	24
7. Etude du pouvoir hémolytique naturel du sérum humain vis-à-vis des globules de quelques animaux.....	26
8. Technique de la réaction.....	33
9. Interprétation des résultats.....	36
10. Conclusions.....	42

Vu et permis d'imprimer :
Montpellier, le 2 juillet 1919.
Le Président de la Thèse,
ASTRUC.

Vu :
Montpellier, le 2 juillet 1919.
Le Directeur de l'Ecole,
G. MASSOL.

Vu et permis d'imprimer :
Montpellier, le 2 juillet 1919.
Le Recteur,
Ant. BENOIST.

